Bol. Soc. Hist. Nat. Balears, 27 (1983) 127-143. Palma de Mallorca.

LA MIGRACION DE DOLLFUSINUS FRONTALIS BIOCCA ET FERRETTI, 1958 (TREMATODA: BRACHYLAIMIDAE) EN EL MICROMAMIFERO HOSPEDADOR DEFINITIVO

S. MAS-COMA[1]
I. MONTOLIU[2]
M. GRACENEA[2] y
M. A. VALERO[1]

RESUMEN. Exposición de las distintas experiencias llevadas a cabo, tanto *in vivo* con ratones y ratas, como *in vitro* mediante órganos aislados de ratón, con el fin de dilucidar cual es o cuales son las vías de migración seguidas por *Dollfusinus frontalis* Biocca et Ferretti, 1958 (Trematoda: Brachylaimidae) a nivel de micromamífero hospedador definitivo, desde el momento en que el estadío infestante de metacercaria es ingerido vía oral conjuntamente con el molusco Gasterópodo Pulmonado terrestre segundo hospedador intermediario y hasta llegar a alcanzar el microhábitat final constituido por las fosas nasales y los senos frontales, donde se desarrollará el estadío adulto. Los resultados de los ensayos experimentales efectuados vienen a indicar que aparentemente sólo aquellas metacercarias que, en el momento de ser masticado el Gasterópodo a nivel bucal, son capaces de salir de la cavidad pericárdica del caracol por rotura de la misma y de contactar y adherirse rápidamente a alguna mucosa bucal o lingual, evitando así su posterior deglución, serán las que podrán migrar con éxito hasta alcanzar vía directa las fosas nasales y senos frontales a las pocas horas de la ingestión del molusco por parte del mamífero.

SUMMARY. Exposition of the different experiences carried out, whether *in vivo* with mice and rats as *in vitro* with mouse isolated organs, in order to elucidate which is or are the routes of migration followed by *Dollfusinus frontalis* Biocca et Ferretti, 1958 (Trematoda: Brachylaimidae) at the level of the small mammal definitive host, from the moment in which the infesting stage of metacercaria is ingested *via* oral together with the terrestrial Pulmonate Gastropod Mollusc, second intermediate host, and until reaching the final microhabitat constituted by the nasal and frontal sinuses, where the development of the adult

[1] Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Av. Blasco Ibañez 13, 46010 Valencia.
[2] Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, Av. Diagonal s/n, 08028 Barcelona.

stage takes place. The results of the experiences done suggest that apparently only the metacercariae which, when the Gastropod is masticated in the mouyh, are able to escape from the pericardial cavity of the snail after break down of the pericardium and to contact and quickly attach to a bucal or lingual mucosa, thus avoiding their posterior deglution, will be the ones which will migrate successfully until reaching the nasal and frontal sinuses following a direct way within a few hours after the ingestion of the mollusc by the mammal.

INTRODUCCION

Dollfusinus frontalis Biocca et Ferretti, 1958 es la única especie conocida hasta la fecha perteneciente al género *Dollfusinus* Biocca et Ferreti, 1958, incluido sistemáticamente dentro de la subfamilia *Panopistinae* Yamaguti, 1958 (Digenea: *Brachylaimidae*). El interés esencial de esta especie reside en el hecho de constituir la única especie de la familia *Brachylaimidae* Joyeux et Foley, 1930 cuyos adultos ostentan un microhábitat final de parasitación no perteneciente al tracto digestivo ni a glándulas anejas al mismo, concretamente las fosas nasales y los senos frontales de pequeños mamíferos.

Son varios los escritos publicados hasta la fecha referentes a *Dollfusinus frontalis*. Dichos trabajos fueron resumidos en el escrito de MAS-COMA, MONTOLIU y GALLEGO (1980). De entre todos estos trabajos, el estudio de la biología y ecología de su ciclo evolutivo fué abordado por TIMON-DAVID (1964, 1965) en lo que se refiere esencialmente al primer hospedador intermediario en tierras continentales (Sur de Francia), por BARGUES, VALVERDE y MAS-COMA (1983) en lo que se refiere asimismo al primer hospedador intermediario pero en la isla pitiusa de Formentera, por MAS-COMA y KAHMANN (1978) y MAS-COMA y MONTOLIU (1978) en lo referente esencialmente al hospedador definitivo en tierras insulares (islas de Formentera y Menorca) y por MAS-COMA, MONTOLIU y GALLEGO (1980) en lo que respecta al segundo hospedador intermediario en la isla de Formentera. Breves resumenes de los conocimientos disponibles hasta la fecha sobre el ciclo evolutivo de *Dollfusinus frontalis* fueron efectuados por MAS-COMA y MONTOLIU (1979, 1982).

Se trata de un ciclo triheteroxeno. El adulto se localiza en los senos frontales del erizo, *Erinaceus (Aethechinus) algirus vagans* Thomas, 1901 (Insectivora: *Erinaceidae*), y fosas nasales de roedores, *Eliomys quercinus ophiusae* Thomas, 1925 (Rodentia: *Gliridae*) y Rattus rattus Linnaeus, 1758 (Rodentia: *Muridae*), en la isla de Formentera. Los huevos alcanzan el medio externo bien directamente con el estornudo, bien indirectamente tras ser deglutidos, atravesar todo el digestivo y salir con las heces. El primer hospedador intermediario es un caracol terrestre, Molusco Pulmonado perteneciente a las especies

Trochoidea (Xeroplexa) caroli (Dohrn et Heynemann, 1862) y *Cernuella (Cernuella) virgata* (Da Costa, 1778) (*Helicidae*) en Formentera, que ingiere los huevos y en el que se desarrollan unos esporocistos ramificados preferentemente a nivel de hepatopáncreas. En el interior de dichos esporocistos se originan las cercarias, microcercas, que salen de los mismos por los poros de emergencia y a través de vías múltiples alcanzan el exterior. Una vez libres en el medio externo reptan sobre el sustrato, en condiciones de humedad, en búsqueda del segundo hospedador intermediario, otro caracol terrestre perteneciente a las especies *Trochoidea (Xeroplexa) caroli, Cernuella (Cernuella) virgata* o bien el limaco *Milax gagates* (Draparnaud, 1801) *(Milacidae)* en la isla de Formentera, en el que penetran activamente vía poro excretor, urreter, riñon y conexión renopericárdica hasta la cavidad pericárdica que constituye su microhábitat definitivo. Cabe destacar aquí como fenómeno de gran interés la capacidad de autoinfestación que, en la isla de Formentera, muestran los caracoles de las especies *Trochoidea (Xeroplexa) caroli* y *Cernuella (Cernuella) virgata,* actuando un mismo individuo simultáneamente de primer hospedador intermediario albergante de esporocistos cercariógenos a nivel de hepatopáncreas y de segundo hospedador intermediario albergante de metacercarias a nivel de pericardium, de tal modo que son precisamente los caracoles emisores de cercarias los que suelen presentar un mayor número de metacercarias y consecuentemente los transmisores preferentes del parásito. El ciclo se cierra cuando el micromamífero hospedador definitivo se infesta mediante metacercarias al ingerir un caracol segundo hospedador intermediario albergante de dichos estadíos metacíclicos infestantes.

Cabe observar, pues, que, si bien restan aún algunos aspectos biológicos y ecológicos por dilucidar, el ciclo evolutivo de *Dollfusinus frontalis* es conocido en la actualidad por lo menos en lo que se refiere a todas sus grandes fases excepto una. Esa única fase del ciclo de la cual no se dispone hasta la fecha de dato alguno es concretamente la vía o vías de migración seguidas por el Digénido a nivel de micromamífero hospedador definitivo, desde el momento en que el estadío infestante de metacercaria es ingerido vía oral conjuntamente con el Molusco Gasterópodo Pulmonado terrestre segundo hospedador intermediario y hasta llegar a alcanzar el microhábitat final constituido por las fosas nasales y senos frontales, donde se desarrollará el estadío adulto. Tanto la fase previa de crecimiento y maduración de la metacercaria dentro del pericardium del caracol, como la fase posterior de desarrollo de los adultos dentro del microhábitat final a nivel de mamífero son conocidas exhaustivamente gracias respectivamente a los trabajos de MAS-COMA y KAHMANN (1978) y MAS-COMA, MONTOLIU y GALLEGO (1980).

La finalidad del presente escrito es precisamente la de exponer las distintas experiencias efectuadas, tanto en un laboratorio improvisado en la isla de Formentera como en el laboratorio del Departamento, con el fin de dilucidar la ruta de migración en cuestión a nivel de micromamífero hospedador definitivo.

HIPOTESIS Y DATOS DE PARTIDA

El microhábitat final de *Dollfusinus frontalis* dentro del hospedador definitivo está constituido por las fosas nasales y senos frontales de los micromamíferos. Ello implica la necesidad de una migración más o menos compleja, desde el momento de la entrada en la boca del caracol transportador de metacercarias infestantes hasta dichas fosas nasales y dichos senos frontales. *A priori* son varios los caminos que puede seguir la metacercaria hasta alcanzar el microhábitat final:

– vía más corta: liberación de las metacercarias de la cavidad pericárdica ya a nivel bucal, para seguir luego la vía directa de boca a fosas nasales y senos frontales, y, por tanto, sin que tenga lugar una deglución ni migración compleja de las metacercarias;

– vía exclusivamente digestiva: deglución de las metacercarias hasta nivel esofágico, gástrico o intestinal, para migrar éstas, una vez liberadas de la cavidad pericárdica del caracol, en sentido inverso, es decir, vía ascendente por el digestivo hasta llegar a las fosas nasales y senos frontales;

– vía extradigestiva: deglución de las metacercarias hasta nivel esofágico, gástrico o intestinal, para posteriormente, tras ser liberadas las metacercarias de la cavidad pericárdica del caracol, atravesar la pared del digestivo a uno u otro nivel (esofágico, estomacal, intestinal), alcanzar la cavidad correspondiente según el caso (cavidad torácica, cavidad abdominal), penetrar en los pulmones para poder ascender luego por el árbol respiratorio (bronquiolos, bronquios, tráquea) hasta alcanzar las fosas nasales y senos frontales;

– vía circulatoria: deglución de las metacercarias hasta nivel esofágico, gástrico o intestinal, para posteriormente, tras ser liberadas las metacercarias de la cavidad pericárdica del caracol, penetrar en la pared del digestivo a uno y otro nivel (esofágico, estomacal, intestinal) y acceder a algún capilar o vaso de la zona correspondiente para luego, vía circulatoria, bien llegar a los pulmones y ascender por el árbol respiratorio, bien permaneciendo dentro del sistema circulatorio, llegar a alcanzar las fosas nasales y senos frontales;

–vía nerviosa: deglución de las metacercarias hasta nivel gástrico o intestinal, para posteriormente, tras ser liberadas las metacercarias de la cavidad pericárdica del caracol, penetrar en la pared del digestivo a uno u otro nivel (estomacal, intestinal), acceder a la cavidad abdominal y a su través alcanzar el canal medular de la espina dorsal, ascender hasta el cerebro y finalmente vía nervios olfatorios llegar a alcanzar los senos frontales y las fosas nasales.

En realidad no cabe descartar *a priori* ninguna de las posibles vías de migración expuestas, puesto que todas ellas pueden ser seguidas por larvas de Helmintos y de hecho son utilizadas parcialmente, en mayor o menor extensión del camino implicado en cada una, por Helmintos parásitos de Mamíferos, incluso del Hombre, en algunos casos de determinadas especies. Como ejemplos dentro de los Trematodos Digénidos podemos citar las vías de migración a nivel de hospedador definitivo seguidas por las larvas de *Paragonimus westermani* (Kerbert, 1878) (véase YOKOGAWA, YOSHIMURA, SANO, OKURA & TSUJI, 1962), de *Brachylaima oesophagei* (Shaldybin, 1953) (=*Brachylaima fulvus* Dujardin, 1843) (véase LEWIS, 1968), o la que muy probablemente siguen las metacercarias de *Troglotrema acutum* (Leuckart, 1842) (véase VOGEL & VOELKER , 1978). Cabe citar también como ejemplos, pero de Helmitos pertenecientes a la Clase de los Nematodos, las vías de migración seguidas por las larvas de *Ascaris lumbricoides* Linnaeus, 1758 (véase RANSON & CRAM, 1921), de *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (véase MACKERRAS & SANDARS, 1955; ALICATA, 1965), o de *Skrjabingylus nasicola* Leuckart, 1842 (véase LANKESTER & ANDERSON, 1971), por sólo mencionar algunos pocos Nematodos muy conocidos.

De todos modos, ciertos aspectos de *Dollfusinus frontalis* parecen apuntar en uno u otro sentido. Así, por un lado, las relativamente notables dimensiones de las metacercarias nos permiten descartar, casi sin lugar a dudas, las posibilidades de seguir las vías circulatoria o nerviosa. Por otro lado, la ausencia de estilete en la metacercaria viene a sugerir la incapacidad de la misma de atravesar la pared del digestivo o de penetrar en la misma, si bien la presencia de los dos complejos glandulares laterales preacetabulares presentes en la metacercaria (véase MAS-COMA, MONTOLIU y GALLEGO, 1980) podría llevar a pensar, caso de aceptar que se tratase de glándulas de penetración (como sucede en las cercarias), en una migración más o menos compleja. Incluso las afinidades sistemáticas próximas a las especies del género *Brachylaima* cuyo microhábitat final lo constituye preferentemente el esófago pero también el estómago (véase el caso de *Brachylaima fulvus* Dujardin, 1843=*Brachylaima oesophagei* Shaldybin, 1953, parásito de las musarañas descrito por LEWIS, 1969, JOURDANE, 1971, MAS-COMA y GALLEGO, 1975 y MAS-COMA, 1977). También la natu-

raleza de los caracoles de las especies *Trochoidea (Xeroplexa) caroli* y *Cernuella (Cernuella) virgata,* segundos hospedadores intermediarios preferentes en la isla de Formentera, sugieren la existencia de una migración más o menos compleja a partir del estómago o intestino, puesto que en la Naturaleza y de acuerdo con los resultados de los exámenes de los contenidos estomacales del lirón careto, a su vez hospedador definitivo preferente, este Roedor suele ingerir dichos caracoles de reducidas dimensiones en general intactos, esto es, sin ser previamente masticados, lo cual evidentemente sugiere una liberación de las metacercarias de la cavidad pericárdica de los Gasterópodos como mínimo a nivel estomacal o intestinal.

Para poder dilucidar cual o cuales de todas las posibilidades citadas es la seguida por las metacercarias de *Dollfusinus frontalis* en su migración dentro del hospedador definitivo hasta alcanzar las fosas nasales y los senos frontales, se procedió a afectuar numerosas experiencias de infestación en ratón y en rata las cuales son detalladas a continuación, tanto en su naturaleza como en sus resultados.

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

Los ensayos consistieron en la infestación experimental, mediante metacercarias infestantes, de roedores de laboratorio, según distintos tipos de experiencias, con el fin de poder seguir la ruta de migración de las metacercarias a través de su búsqueda y hallarzgo en los animales experimentalmente infestados inmediatamente tras muerte y disección, llevándose a cabo las aludidas autopsias a tiempos escalonados a partir del momento de la infestación.

MATERIALES

Las metacercarias utilizadas para los ensayos de infestación fueron obtenidas en la disección de ejemplares, emisores y no emisores de cercarias de *Dollfusinus frontalis,* de caracoles de las especies *Trochoidea (Xeroplexa) caroli* y *Cernuella (Cernuella) virgata* naturalmente infestados y recolectados en determinados enclaves previamente prospectados de la isla de Formentera.

Los roedores utilizados en las experiencias fueron el ratón casero, concretamente individuos procedentes de una cepa peridoméstica de *Mus musculus* mantenida en el Laboratorio, y la rata albina *Rattus norvegicus* de laboratorio, concretamente especímenes de aproximadamente unos 200 g de peso. Se ha procurado, siempre que se pudiese, mantener los lotes de roedores a ensayar bajo un ayuno mínimo de 24 horas, si bien en algunos casos no se tomó pre-

caución alguna, siguiendo los animales una dieta simple a base de pan y agua natural.

Debido al hecho de que los animales ensayados eran de laboratorio y por tanto no habituados a la depredación de caracoles, se ha procedido a utilizar, como medios o utensilios de inyección, sonda gástrica, pipeta clásica de Pasteur o jeringas hipodérmicas, según los tipos de experiencias. La intubación de las metacercarias se ha afectuado en medio líquido, tanto suero fisiológico como agua natural según los casos, medio en el que previamente se había aislado las metacercarias tras la disección del caracol. Se trata de métodos precisos que permiten conocer el número exacto de metacercarias con que se infesta experimentalmente.

Metodos y Experiencias

Detallamos a continuación las distintas técnicas empleadas según las experiencias que se ha llevado a cabo, separando las seguidas en el caso de infestación de ratones de las seguidas para infestar ratas.

Experiencias de Infestacion en Raton

A) INFESTACION A NIVEL BUCAL (EXPERIENCIA TIPO I)

La infestación a nivel bucal la hemos realizado mediante una pipeta Pasteur, depositando las metacercarias en suspensión en la boca del animal y estimulando el reflejo de deglución, de modo que tragase libremente. El medio líquido utilizado en este caso es el agua natural.

B) INFESTACION A NIVEL ESTOMACAL

a) Con metacercarias libres previa neutralización del pH estomacal (EXPERIENCIA TIPO II)

Este tipo de experiencia se realizó con animales en los que se neutralizó el pH estomacal, administrándoles Gelotrisin antes de proceder a la infestación.

Para calcular el intervalo de tiempo durante el cual tendría que actuar el antiácido, fueron realizados varios ensayos con iguales dosis, sacrificando pos-

teriormente al animal a diferentes tiempos y midiendo su pH estomacal, mediante papel indicador MERCK. El pH del contenido gástrico de un ratón cualquiera sacrificado dió un valor de 5.

Se empleó para estos ensayos de prueba de la droga una solución formada por 1 g de GELOTRISIN en 20 ml de agua natural, dando un pH de 8,5. Seguidamente se procedió a la intubación, mediante sonda gástrica, de 6 ratones con 1 ml de esta solución de GELOTRISIN por individuo.

Transcurrida media hora desde la intubación se procedió a diseccionar 2 de los ratones intubados, alcanzando ambos un pH del contenido gástrico de 6. Otros 2 ratones fueron abiertos pasada una hora desde la intubación, alcanzando uno de ellos un pH del contenido gástrico de 6-7 y el otro un pH de 5-6. Por último se diseccionó los 2 últimos ratones transcurridas dos horas desde la intubación de GELOTRISIN, obteniéndose un pH del contenido gástrico de 5-6 para el primero y de 6-7 para el segundo.

En vista de los resultados obtenidos se dedujo que, a corto plazo, el tiempo no influía en el pH gástrico tras la intubación del antiácido.

La infestación de ratones a nivel estomacal, intubados previamente con GELOTRISIN, con metacercarias libres, se ha llevado a cabo mediante sonda gástrica, siguiendo el método habitual.

b) Con metacercarias libres sin previa neutralización del pH estomacal (EXPERIENCIA TIPO III)

Se ha realizado una serie de infestaciones en ratones a nivel estomacal y sin previa intubación con GELOTRISIN, con metacercarias libres, previamente aisladas del caracol, mediante sonda gástrica.

c) Con metacercarias libres previa ligadura del píloro (EXPERIENCIA TIPO IV)

Esta experiencia ha requerido una operación del animal, previamente anestesiado con éter, en la cual se efectuó una ligadura alrededor del píloro y se cerró el animal mediante una sutura realizada con hilo y aguja de coser normales.

Concretamente, en este caso, se ensayó con un solo ratón que fué intubado por sondaje gástrico con metacercarias una hora despues de realizada la operación de ligadura de píloro.

d) Con metacercarias administradas junto con el órgano del caracol al que parasitan (EXPERIENCIA TIPO V)

En este caso, en vez de intubar metacercarias libres, lo que se introduce en el estómago del animal es la cavidad pericárdica del caracol que todavía no ha sido desgarrada, conteniendo las metacercarias que se pueden observar por transparencia pero sin llegar a poder contar exactamente el número de ellas. Para la realización de esta experiencia se utilizó una pipeta Pasteur que se había pasado previamente por una llama para poder obtener el grado de curvatura necesario en el capilar y también conseguir un extremo romo no cortante.

C) INFESTACION A NIVEL INTESTINAL

a) Vía directa en disección in vivo con infestación a nivel de íleon distal tras ligadura de píloro y zona prececal (EXPERIENCIA TIPO VI)

La experiencia consistió en realizar previamente una ligadura en el píloro y otra en la zona intestinal justamente anterior al ciego. Antes de coser al animal se procedió a intubar directamente, es decir, a ratón abierto. La intubación se realizó practicando una incisión en el íleon distal, cercano a la confluencia con el ciego, por la que se introdujo, mediante una pipeta Pasteur, las metacercarias aisladas en suero fisiológico a partir de un caracol segundo hospedador. En el momento justo de la extracción de la pipeta se efectuó oportunamente y de modo rápido una ligadura en el nivel en cuestión para con ello cerrar el intestino. Seguidamente se procedió a coser al animal que quedó bajo vigilancia.

b) En intestino delgado aislado y mantenido in vivo (EXPERIENCIA TIPO VII)

Se aisló *in vitro* la primera mitad del intestino delgado de un ratón cualquiera. Para ello, se extrajo la porción intestinal en cuestión para colocarla en una cápsula de Petri conteniendo suero fisiológico tibio. Seguidamente se procedió a la intubación de las metacercarias mediante pipeta Pasteur a través de uno de los dos extremos abiertos de la porción intestinal y acto seguido se realizó un ligamiento en cada extremo de la misma, quedando así las metacercarias aisladas entre ambas ligaduras. Como es lógico, esta experiencia hubiera tenido que realizarse en medio Tyrode y a una temperaturaa de 36-37 °C, o en su caso incluso en condiciones *in vitro* más adecuadas, pero desgraciadamente

ello nos fué imposible dada la necesidad imperiosa de realizar la experiencia improvisadamente en la isla de Formentera.

La finalidad de esta experiencia era averiguar si las metacercarias son capaces de atravesar el intestino delgado, hecho que si se produjese nos llevaría a detectar metacercarias libres por la cápsula de Petri en la que se halla el intestino aislado.

D) INFESTACION INTRAPERITONEAL (EXPERIENCIA TIPO VIII)

En esta experiencia se procedió a la infestación de un ratón a nivel de la cavidad abdominal con metacercarias libres ya aisladas mediante inyección intraperitoneal.

EXPERIENCIAS DE INFESTACION EN RATA

A) INFESTACION A NIVEL BUCAL (EXPERIENCIA TIPO IX)

En este tipo de infestación se procedió del mismo modo que el descrito en el apartado correspondiente a la infestación a nivel bucal de ratones.

B) INFESTACION A NIVEL ESTOMACAL PREVIA NEUTRALIZACION DEL pH GASTRICO (EXPERIENCIA TIPO X)

Previamente a la infestación de las ratas se procedió a intubarlas con 1 ml de solución de GELOTRISIN, con el fin de neutralizar su pH estomacal. La solución se preparó disolviendo 3,2 g de GELOTRISIN en 20 ml de agua natural. Transcurrida una hora se les intubó las metacercarias mediante sonda gástrica.

C) INFESTACION A NIVEL ESTOMACAL SIN PREVIA NEUTRALIZACION DEL pH GASTRICO (EXPERIENCIA TIPO XI)

Según la clásica técnica de intubación por sonda gástrica se ha realizado una serie de infestaciones en ratas a nivel estomacal, sin previa intubación con GELOTRISIN, con metacercarias libres.

RESULTADOS

Los ensayos de infestación llevados a cabo y sus respectivos resultados, según la especie de roedor utilizada, son los que se exponen a continuación.

EXPERIENCIAS DE INFESTACION EN RATON

EXPERIENCIA TIPO I (infestación a ñivel bucal):

– infestación de 1 ratón con 9 metacercarias y disección del mismo a las 2 horas 15 minutos: hallazgo de una metacercaria en las fosas nasales (todo el digestivo resultó negativo);

– infestación de 1 ratón con 48 metacercarias y disección del mismo a las 4 horas: todo el digestivo, cavida bucal y fosas nasales resultaron negativos;

– infestación de 6 ratones con 10 metacercarias cada uno y disecciones respectivas a las 4 horas y 10 minutos, 4 horas y 30 minutos, 9 días y 14 días: todos los digestivos, cavidades bucales, y fosas nasales resultaron negativos.

EXPERIENCIA TIPO II (infestación a nivel estomacal con metacercarias libres previa neutralización del pH estomacal):

– infestación de 4 ratones con 12 metacercarias cada uno (trascurridos 45 minutos desde el momento de la intubación con GELOTRISIN): hallazgo de 1 metacercaria muerta en el estómago y 6 vivas en el duodeno de un primer ratón examinado a los 15 minutos de la infestación, de 1 metacercaria viva en el estómago y 1 en el duodeno en un segundo ratón examinado a los 30 minutos, de 5 metacercarias vivas en el intestino delgado de un tercer ratón examinado a los 45 minutos, y de 1 metacercaria viva en el intestino delgado del cuarto ratón examinado a los 60 minutos; el resto del digestivo y fosas nasales de los ratones ensayados resultaron negativos;

–infestación de 1 ratón con 48 metacercarias (transcurridos 50 minutos desde la intubación con GELOTRISIN) y disección del mismo a los 16 días: todas las vísceras y fosas nasales resultaron negativas.

EXPERIENCIA TIPO III (infestación a nivel estomacal con metacercarias libres sin previa neutralización del pH estomacal):

– infestación de 6 ratones con aproximadamente 20 metacercarias cada uno y posteriores disecciones de los mismos a distintos tiempos consecutivos, el primero a los 45 minutos de la infestación y los restantes a intervalos de 15 minutos a partir del primero: todos los digestivos y fosas nasales resultaron negativos;

– infestación de 6 ratones con 10 metacercarias cada uno: hallazgo de 6 metacercarias muertas en el estómago de un primer ratón examinado transcurrida 1 hora tras la infestación, resultando todos los demás negativos (digestivo y fosas nasales) al ser examinados respectivamente a las 2 horas, 2 horas 20

minutos, 4 horas 15 minutos y 2 ratones ambos a las 5 horas de la infestación;

– infestación de 9 ratones con 10 metacercarias cada uno y disecciones respectivas a las 24 horas, 24 horas 50 minutos, 25 horas 45 minutos, 3 de ellos a los 5 días y los restantes a los 10, 16 y 21 días: todas las vísceras y fosas nasales resultaron negativas.

EXPERIENCIA TIPO IV (infestación a nivel estomacal con metacercarias libres previa ligadura de píloro):

– infestación de 1 ratón con 10 metacercarias y disección del mismo a las 6 horas de la infestación: estómago, esófago y fosas nasales resultaron negativos (el estómago del ratón presentaba un pH estomacal =2-3 en el momento de ser examinado).

EXPERIENCIA TIPO V (infestación a nivel estomacal con metacercarias administradas junto con el órgano del caracol al que parasitaban):

– infestación de 1 ratón con un número indeterminado de metacercarias dentro de la cavidad pericárdica de un caracol y disección del mismo a 1 hora 10 minutos de la infestación: todo el digestivo y fosas nasales resultaron negativos.

EXPERIENCIA VI (infestación a nivel intestinal por vía directa en disección in vivo con infestación a nivel de íleon distal tras ligadura de píloro y zona prececal):

– infestación de 1 ratón con 24 metacercarias y disección del mismo a las 6 horas: hallazgo de 11 metacercarias vivas en la zona intestinal próxima al lugar de la intubación;

– infestación de 1 ratón con 58 metacercarias y disección del mismo a las 5 horas: hallazgo de 48 metacercarias vivas en el intestino.

EXPERIENCIA TIPO VII (infestación a nivel intestinal en intestino delgado aislado y mantenido in vitro):

– introducción de 19 metacercarias en el intestino mantenido in vitro y ulterior examen del mismo a las 17 horas: hallazgo de las mismas 19 metacercarias muertas en el interior de la porción intestinal aislada.

EXPERIENCIA TIPO VIII (infestación intraperitoneal):

– Infestación de 1 ratón con 34 metacercarias y disección del mismo a los 16 días: todos los órganos y fosas nasales resultaron negativos.

Experiencias De Infestacion En Rata

EXPERIENCIA TIPO IX (infestación a nivel bucal):

– infestación de 3 ratas con 8, 9 y 12 metacercarias cada una y disecciones respectivas a los 10, 17 y 24 días: todos los órganos y fosas nasales resultaron negativos.

EXPERIENCIA TIPO X (infestación a nivel estomacal previa neutralización del pH estomacal):

– infestación de 3 ratas con 6, 10 y 10 metacercarias cada una y disecciones respectivas a los 10, 17 y 24 días: todos los órganos y fosas nasales resultaron negativos.

EXPERIENCIA TIPO XI (infestación a nivel estomacal sin previa neutralización del pH estomacal):

– infestación de 7 ratas con aproximadamente 20 metacercarias cada una y posteriores disecciones respectivas a los 45 minutos, 1 hora, 1 hora, 1 hora 15 minutos, 1 hora 30 minutos, 1 hora 45 minutos, 2 horas y 2 horas 15 minutos: hallazgo de 2 metacercarias muertas en el estómago de la rata examinada a 1 hora, resultando negativos los digestivos y fosas nasales de las restantes.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en las experiencias en cuestión cabe deducir que por el momento debe admitirse la viabilidad de la primera de las hipotéticas vías de migración anteriormente enumeradas, esto es, la vía más corta y directa de la boca a fosas nasales sin deglución ni migración larga y compleja de las metacercarias, tal y como se desprende del resultado positivo obtenido en un ensayo de infestación correspondiente a una experiencia de tipo I (infestación de ratón a nivel bucal), a pesar de haberse hallado una única metacercaria en las fosas nasales.

En cuanto a la posibilidad de excluir con seguridad la existencia de alguno otra vía de migración, es quizás aún un poco prematuro y ello debería confrontarse con un número mayor de experiencias. De todos modos, los ensayos llevados a cabo vienen a indicar que las metacercarias que alcanzan el estómago, o bien son digeridas en condiciones de acidez gástrica, o bien son capaces

de superar el tránsito estomacal en condiciones de pH gástrico próximo a la neutralidad. Aquellas metacercarias que llegan al intestino, caso de no ser digeridas en él, parece que son eliminadas sin más problemas al exterior con las heces. Sea como sea, todo parece indicar que las metacercarias, una vez alcanzado el estómago o el intestino, son incapaces de iniciar migración alguna, ya sea intradigestiva en sentido ascendente, ya sea extradigestiva atravesando o penetrando en la pared del digestivo.

En conclusión pues, aparentemente sólo aquellas metacercarias que en el momento de ser masticado el Gasterópodo a nivel bucal son capaces de salir de la cavidad pericárdica del caracol por rotura de la misma y de contactar y adherirse rápidamente a alguna mucosa bucal, lingual o cualquier otra, evitando así su posterior deglución, serán las que podrán migrar con éxito hasta alcanzar vía directa las fosas nasales y senos frontales a las pocas horas de la ingestión del Molusco por parte del Mamífero.

Resulta interesante recalcar que dicha vía migratoria en *Dollfusinus frontalis* es, pues, aparentemente distinta por completo de la que debe seguir *Troglotrema acutum,* Digénido *Troglotrematidae* que ostenta idéntico microhábitat final de parasitación, los senos paranasales de Carnívoros (*Mustelidae* del género *Mustela*) en Europa. En el caso de *Troglotrema acutum* las metacercarias son enquistadas (a nivel de la musculatura de Anfibios –*Rana temporaria*– que actúan de segundo hospedador intermediario), de tal modo que los estudios llevados a cabo *in vitro* sugieren la necesidad de alcanzar por lo menos el estómago del Mustélido para poder darse el imprescindible desenquistamiento de la metacercaria previo a la iniciación de la migración intraorgánica (véase VOGEL & VOELKER, 1978).

Otro aspecto a resaltar que se deduce del ensayo experimental positivo de infestación con *Mus musculus* es que es indudable que *Dollfusinus frontalis* es capaz de alcanzar las fosas nasales en micromamíferos de pequeñas dimensiones. Ello contrasta con el hecho de que hasta la fecha los adultos de este Brachyláimido sólo se hayan detectado en la naturaleza parasitando a Insectívoros y Roedores de tamaño considerable y por tanto con senos frontales y fosas nasales lo suficientemente espaciosos como para albergar los parásitos (MAS-COMA y MONTOLIU, 1978), a pesar de resultar evidente la escasa especificidad de los adultos y consecuentemente presuponer como hospedadores definitivos potenciales todos aquellos micromamíferos en cuya dieta alimenticia entran a formar parte los Gasteropodos Pulmonados terrestres, traduciéndose su mayor o menor asiduidad como componentes de dicha dieta nutricia en respectivos mayores o menores índices de parasitación por *Dollfusinus frontalis* en el mamífero, tanto a nivel individual (MAS-COMA y KAHMANN, 1978, demuestran

la inexistencia de premunición en las infestaciones por esta especie) como general (MAS-COMA y MONTOLIU, 1978, muestran como en la isla de Formentera el lirón careto constituyente el hospedador definitivo habitual del parásito, mientras rata y erizo actúan como tal únicamente de modo secundario). La explicación a la no detección de adultos de *Dollfusinus frantalis* en micromamíferos menores, pero también depredadores de caracoles, como son por ejemplo *Mus musculus* y *Apodemus sylvaticus* (Linnaeus, 1758) (*Muridae*) en Formentera, y en los que las metacercarias son perfectamente capaces de alcanzar las fosas nasales (por lo menos en *Mus musculus* de acuerdo con la experiencia anteriormente aludida), cabe buscarla pues en la angostidad de sus fosas nasales. Tal carencia de espacio impediría o dificultaría el normal desarrollo de los adultos. Además, hay que tener en cuenta que la respiración en todos los micromamíferos es fundamentalmente nasal, de manera que en los animales pequeños la presencia de *Dollfusinus frontalis* en las fosas nasales puede llegar a representar problemas mucho mayores que en los animales grandes, con lo que para evitar la consecuente obstrucción de las fosas nasales los pequeños animales deben forzar probablemente la expulsión de los adultos nasales con el estornudo. Este hecho es perfectamente asumible, puesto que los adultos de *Dollfusinus frontalis* no muestran precisamente ningún tipo o modo especial ni de fijación ni de mantenimiento de la localización dentro del microhábitat nasal.

Desde el punto de vista ecológico, cabe destacar las notables pérdidas que sufre el ciclo evolutivo de *Dollfusinus frontalis* en esta fase de la infestación del hospedador definitivo. De acuerdo con los resultados expuestos en el presente trabajo, dichas pérdidas pueden tener lugar según tres modos:

a) las pérdidas representadas por todas aquellas metacercarias presentes en caracoles que, por los motivos que sean (muerte del caracol por causa distinta a la depredación), nunca llegan a alcanzar al hospedador definitivo;

b) las pérdidas representadas por aquellas metacercarias que acceden a hospedadores definitivos inadecuados por depredación del caracol que las alberga (Vertebrados distintos, incluso micromamíferos pequeños con senos frontales y fosas nasales demasiado angostos, en los que el adulto no se desarrolla, aún y cuando la metacercaria haya podido alcanzar el microhábitat final que le es própio);

c) las pérdidas representadas por todas aquellas metacercarias que, aún y a pesar de haber accedido, por depredación del caracol que las alberga, a un micromamífero adecuado (hospedador definitivo viable), no tienen la suerte de verse liberadas del pericardium a nivel bucal (y en consecuencia de poder seguir la vía migratoria directa hasta el microhábitat final), sino que son ingeri-

das conjuntamente con todo el caracol, alcanzando estómago e intestino y siendo posteriormente evacuadas cuando no digeridas; igual suerte, cabe lógicamente presuponer, habrán de seguir todas aquellas metacercarias que no hayan alcanzado todavía el estadío de madurez suficiente como para ser infestantes en el momento de ser depredado el caracol que las albergaba.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren expresar su agradecimiento al Prof. Dr. E. GOÑALONS y Dr. C. FELIU (Barcelona) y Dr. J. G. ESTEBAN (Valencia), por su colaboración desinteresada.

BIBLIOGRAFIA

ALICATA, J. E., 1965.– Biology and distribution of the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis,* and its relationships to eosinophilic meningoencephalitis and other neurological disorders of man and animals. *Adv. Parasit.,* 3: 223-248.

BARGUES M. D., VALVERDE F. y MAS-COMA S., 1983.– La cercariogénesis intraesporocística en *Dollfusinus frontalis* Biocca et Ferretti, 1958 (Trematoda: *Brachylaimidae*). *III Cong. Nac. Parasit. (Barcelona),* Resúmenes de las Comunicaciones presentadas en la Sesión de "Fisiología y Bioquímica. Cultivos experimentales (II)": 93.

JOURDANE, J., 1971.– Helminthes parasítes des Micromammifères des Pyrénées-Orientales II. Les Plathelminthes de *Soricinae. Ann. Parasitol. hum. comp.,* 46 (5): 553-574.

LANKESTER, M. W., & ANDERSON, R. C., 1971.– The route of migration and pathogenesis of *Skrjabingylus* spp. (Nematoda: Metastrongyloidea) in Mustelids. *Can. J. Zool.,* 49: 1283-1293.

LEWIS J. W., 1969.– Studies on the life history of *Brachylaimus oesophagei* Shaldybin, 1953 (Digenea: *Brachylaimidae*). *J. Helminth.,* 43 (1/2): 79-98.

MACKERRAS, M. J. & SANDARS, D. F., 1955.– The life history of the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis* (Chen) (Nematoda: *Metastrongyloidea*). *Austr. J. Zool.,* 3: 1-21.

MAS-COMA, S., 1977.– Contribución al conocimiento de la helmintofauna de micromamíferos ibéricos. I. Parásitos de *Neomys fodiens Pennant, 1771* (Insectivora: *Soricidae*). *Rev. Ibèr. Parasit.,* 37 (3/4): 227-242.

MAS-COMA, S. y GALLEGO, J., 1975.– Contribución al conocimiento de la helmintofauna de micromamíferos ibéricos. I. Parásitos de *Sorex* spp. (Insectivora: *Soricidae*). *Rev. Ibér. Parasit.,* 35 (3/4): 261-181.

MAS-COMA, S. y KAHMANN, H. 1978.– Zur Bionomie von *Dollfusinus frontalis* Biocca et Ferretti, 1958 (Trematoda, *Brachylaemidae*), Schmarotzer im Sinus frontalis und Cavum nasi von kleinen Säugetiere (Insectivora, Rodentia). *Acta Parasit. Polon.,* 25 (15): 135-147 + I pl.

MAS-COMA, S. y MONTOLIU, I. 1978.– Sobre la biología de los Trematodos del lirón careto, *Eliomys quercinus ophiusae* Thomas, 1925 (Rodentia: *Gliridae*), en Formentera (Islas Pitiusas). *Rev. Ibér. Parasit.,* 38 (1/2): 95-109.

MAS-COMA, S. y MONTOLIU, I. 1979.– Estudios sobre el ciclo evolutivo de *Dollfusinus frontalis* Biocca et Ferretti, 1958 (Trematoda: *Brachylaemidae*). *II Cong. Nac. Parasit.* (*León*), Sección 2: 97.

MAS-COMA, S. y MONTOLIU, I. 1982.– Life cycle of *Dollfusinus frontalis* Biocca et Ferretti, 1958 (Trematoda: *Brachylaimidae)* on Formentera Island (Spain). *V Int. Cong. Parasit.* (Toronto). Abstracts of Papers. *Molecular and Biochemical Parasitology,* Suppl.: 324

MAS-COMA, S., MONTOLIU, I. y GALLEGO, J. 1980.– Crecimiento y maduración de la metacaria de *Dollfusinus frontalis* Biocca et Ferretti, 1958 (Trematoda: *Brachylaimidae)* en condiciones experimentales. *Cir. Farm.,* Barcelona, 38 (267): 153-170.

RANSOM, B.H. & CRAM, E.B. 1921.– The course of migration of *Ascaris* larvae. *J. Parasitol.,* 2: 80-86.

TIMON-DAVID, J. 1964.– Développement expérimental et formes larvaires de *Dollfusinus frontalis* Biocca et Ferretti, 1958 (Trematoda, Digenea), parasite des sinus frontaux du Hérisson. *C.R. Acad.Sc. Paris,* 258: 3755-3757.

TIMON-DAVID, J. 1965.– Développement experimental, formes larvaires et cycle vital de *Dollfusinus frontalis* Biocca et Ferretti, 1958 (Trematoda, Digenea, *Leucochloridiidae*) parasite des sinus frontaux du Hérisson. *Ann. Parasitol. hum. comp.,* 40 (3): 265-284.

VOGEL, H. & VOELKER, J. 1978.– Über den Lebenzyklus von *Troglotrema acutum. Tropenmed. Parasit.,* 29: 385-405.

YOKOGAWA, M., YOSHIMURA, H. SANO, M., IKURA, T. & TSUJI, M. 1962.– The route of migration of the larva of *Paragonimus westermani* in the final host. *J. Parasitol.,* 48: 528-531.